



(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.	(11) 공개번호	10-2007-0039447
<i>C12N 9/52</i> (2006.01)	(43) 공개일자	2007년04월12일
<i>C12N 15/00</i> (2006.01)		

(21) 출원번호	10-2005-0094693
(22) 출원일자	2005년10월08일
심사청구일자	2005년11월09일

(71) 출원인	한국해양연구원 경기 안산시 상록구 사동 1270번지
----------	---------------------------------

(72) 발명자	이정현 경기 성남시 분당구 정자동 한솔청구아파트 116-101 권석태 경기 수원시 팔달구 화서동 656 한진현대아파트 107-2002 강성균 경기 안양시 동안구 평촌동 75-1 대우아파트 112-506 김상진 경기 안산시 상록구 사2동 월드아파트 707-904 현정호 경기 성남시 분당구 수내2동 파크타운 대림아파트 105-2001 권개경 경기 안산시 상록구 일동 579-3 2층 김운재 경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호 이현숙 경기 안양시 동안구 평촌동 75-1 대우아파트 112-506 배승섭 경기 안산시 상록구 사동 1519-12 402호 남기훈 경기 수원시 팔달구 화서동 656 한진현대아파트 107-2002 임재규 경기 시흥시 정왕동 1575-9- 203호 전정호 경기 안산시 상록구 사동 1579-2 301호 양성현 경기 안산시 단원구 초지동 그린빌 주공아파트 1509-904
----------	--

(74) 대리인	윤여강 양부현 이문섭
----------	-------------------

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 고희열성 리가아제 효소 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 고호열성 리가아제(ligase) 효소 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, *Thermococcus* sp. 균주로부터 분리되어진 신규의 고호열성 리가아제 효소 및 이의 기능적 동등물, 이들의 아미노산 서열을 가진 단백질 및 고호열성 리가아제 효소 생산방법을 제공한다. 본 발명에 따른 리가아제 효소는 고호열성이다.

대표도

도 3

특허청구의 범위

청구항 1.

*Thermococcus* sp. 균주로부터 분리되어진 고호열성 DNA 리가아제 효소 및 이의 기능적 동등물.

청구항 2.

서열번호의 2의 아미노산 서열을 가진 단백질.

청구항 3.

서열번호 1의 유전자.

청구항 4.

서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자.

청구항 5.

제 1 항에 따른 상기 고호열성 리가아제 효소를 암호화하는 핵산서열.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 서열번호 1의 상기 고호열성 리가아제 효소를 암호화하는 DNA 핵산서열.

청구항 7.

제 5 항에 있어서, 상기 고호열성 리가아제 효소를 암호화하는 DNA 핵산서열이 서열번호 1과 코돈 축퇴성에 의한 등가인 것을 특징으로 하는 핵산서열.

청구항 8.

제 1 항에 따른 고히열성 리가아제 효소가 서열번호 2를 가지는 것을 특징으로 하는 리가아제 효소.

### 청구항 9.

제 1 항에 따른 고히열성 리가아제 효소가 서열번호 2와 기능적으로 동등한 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 리가아제 효소.

### 청구항 10.

제 5 항 내지 제 7 항의 어느 한 항에 따른, 핵산서열을 포함하는 재조합백터.

### 청구항 11.

제 10 항에 있어서, 상기 재조합백터가 도 8에 기재된 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 플라스미드.

### 청구항 12.

제 10 항에 따른 재조합 백터로 형질전환된 세포.

### 청구항 13.

균주 *Thermococcus* sp. NA1. 또는 제 12 항에 따른 형질전환된 세포를 배양하고, 상기 배양된 세포로부터 리가아제 효소를 분리하는 것을 특징으로 하는 고히열성 리가아제 효소 생산방법.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

##### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

게놈의 연구의 최근의 진보는 막대한 양의 서열 정보를 생산했다. 종래의 유전자 공학 및 게놈의 연구 기술의 일반적인 조합과 함께, 몇몇의 고히열성 미생물의 게놈 서열은 생물 공학 분야에서 열에 강한 효소 때문에 관심을 받고 있으며, 많은 매우 열안정적 효소가 생물 공학의 목적으로 개발되고 있다.

DNA 리가아제(EC 6.5.1.1 및 EC 6.5.1.2)는 이중나선 DNA에서 단일가닥의 쪽에서 5'-인산과 3'-하이드록시기 말단을 연결하거나, 상보적인 단일가닥 또는 블런트(blunt) 말단을 가지고 있는 두개 분절을 연결시킨다. 이런 기능이 DNA 복제, 재조합, 및 수선(Lehman 1974, Jessberger 1991, Li 1984, Wood 1988)에서 매우 중요하다. DNA 리가아제는 활성화에 조효소를 필요로 하는가에 따라 두개의 그룹으로 나눈다. ATP를 요구하는 그룹(Kletz, 1992) 및 NAD<sup>+</sup>를 요구하는 그룹(Thorbjarnardottir 1995)이 있다. 높은 유사성이 ATP-의존적 그룹(Kletz 1992) 또는 NAD<sup>+</sup> 의존적 그룹(Thorbjarnardottir 1995)에서 발견되었다. 진핵세포(Johns 1997, Robins 1996, Knopf 1977), 바이러스(odell 1996, Parks 1994), 및 박테리오파아지(Coherty 1996, Knopf 1977)가 ATP-의존적 효소를 가지고 있다. 반면에 세균으로부터의 여러 가지 DNA 리가아제(Ishino 1986, Takahashi 1984, Thorbjarnardottir 1995)가 조효소로서 NAD<sup>+</sup>를 이용한다는 것을 보였다. 생물의 제 3 계인 고세균으로부터의 DNA 리가아제는 거의 알려져 있지 않다. 그러나 최근에 열안정적 리파아제가 고히열성 고세균으로부터 알려졌다(Sriskanda 2000). *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH

(Srisakanda 2000), *Pyrococcus abyssi*(<http://www.genescope.cns.fr/pab/>) *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk 1997), 및 *Methanococcus jannaschii* (Bult 1996)으로부터의 DNA 리가아제에 대한 보고가 고세균 효소는 ATP 의존적이라는 것을 나타낸다(Kletzin 1992). 그러나, *Thermococcus*에 속하는 고세균 리가아제는 아마도 조효소로서  $NAD^+$  및 ATP 모두를 요구할 것이라고 보고되었다(Nakatani et al. 2000; Rolland et al. 2004)

라이게이션(ligation) 분석은 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 결정하는데 이상적인 면이 있다. 그리고 열안정적 DNA 리가아제는 단일-염기 유전 질환을 증폭 및 검출하기 위한 리가아제 연쇄 반응(Ligase chain reaction; LCR)의 핵심 성분이다(Barany 1991) 본 발명자들은 새로운 종의 *Thermococcus*의 신종을 분리하였으며, 지놈 정보의 분석을 통해 리가아제 효소를 가지고 있는 것을 발견하고, 리가아제에 상응하는 유전자의 클로닝하였으며, 대장균에서 발현시켰다. 더욱더 재조합 효소가 분리되어져 그의 효소적 활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 신규의 고호열성인 DNA 리가아제 효소를 제공하는 것이다.

본 발명은 신규의 고호열성인 DNA 리가아제 효소를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

### 발명의 구성

본 발명은 DNA 리가아제 효소 및 이를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 제조방법은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 유전공학적인 방법에 의한 제조방법이다.

본 발명은 DNA 리가아제 효소를 암호화하는 분리된 DNA 서열 및 이를 함유하는 재조합 벡터를 제공한다.

제 1 양태로, 본 발명은 고온에서 안정한 DNA 리가아제 효소를 암호화하는 핵산서열 및 상기 서열에 등가의 핵산서열을 제공한다. 상기 핵산서열들은 보다 구체적으로는 서열번호 1이다.

"등가의 핵산서열"에는 상기 DNA 리가아제 효소 서열의 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.

"코돈 축퇴성 서열"이란 상기 자연 발생의 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 자연 발생의 DNA 리가아제 효소와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산서열을 의미한다.

제 2 양태로, 본 발명은 DNA 리가아제 효소를 제공한다. 보다 상세하게는 서열번호 2로 표시되는 DNA 리가아제 효소 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.

본 발명의 "기능적 동등물"에는 서열번호 2의 DNA 리가아제 효소 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 DNA 중합효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

본 발명은, 제 3 양태로는 상기 DNA 리가아제 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분절을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명에서 사용되는 벡터라는 용어는 또다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 발현벡터란 용어는 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 플라스미드, 코스미드 또는 파아지를 포함한다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터이다.

본 발명의 제 4 양태로는, 상기 재조합벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

본 발명에서 사용되는 '형질전환'이란 용어는 외래 DNA 또는 RNA가 세포에 흡수되어 세포의 유전형이 변화되는 것을 말한다.

적합한 형질전환세포로는 원핵생물, 곰팡이, 식물, 동물세포 등이 포함되나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 대장균을 이용한다.

본 발명의 제 5 양태로는 상기 형질전환 세포, 또는 상기 *Thermococcus* sp.를 이용하여 DNA 리가아제 효소를 생산하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

### [실시예 1] *Thermococcus* sp. NA1으로부터 DNA 리가아제 유전자의 클로닝

#### 균주 및 성장 조건

*E. coli* DH5a가 플라스미드 증식 및 핵산 서열분석을 위해 사용되었다. *E. coli* BL21-Codonplus(DE3)-RIL 세포(스트라타진, 라졸라, 캘리포니아) 및 플라스미드 pET-24a(+)(노바젠, 메이디슨, 위스콘신)가 유전자 발현을 위해 사용되었다. *E. coli* 균주는 37°C에서 루리아-베르타니(Luria-Bertani) 배지 안에서 배양되었고, 카나마이신이 최종농도가 50 $\mu$ g/ml이 되도록 배지에 첨가되었다.

#### DNA 조작 및 서열분석

DNA 조작은 샌프루크 및 러셀에 의해 기술된 것처럼 표준적인 방법으로 행하여졌다. *Thermococcus* sp.의 게놈 DNA는 표준적인 방법으로 분리되었다. 제한효소 및 다른 변형시키는 효소는 프로메가(메이디슨, 위스콘신)으로부터 구매하였다. *E. coli* 세포로부터 플라스미드 DNA의 적은 양의 제조는 플라스미드 미니 키트(퀴아젠, 힐덴, 독일)을 이용하여 행하여졌다. DNA 서열분석은 GenScan(PE Applied Biosystems, 포스터시, 캘리포니아) 프로그램이 장착된 자동 서열분석기(AB3100)로 행하여졌다.

#### TNA1\_lig 유전자의 클로닝 및 발현

*Nde*I 및 *Sal*I 사이트로 플랭크(f flank)된 전장의 *Thermococcus* sp. NA1 리가아제 유전자가 게놈 DNA 및 두 개의 프라이머(센스 [5'-CGACC CGG CAT ATG GGA GAC ATG AAA TAC ACT GAA CTC-3'(서열번호 3)] 및 안티센스[5'-CT CCA CAT GTC GAC CTT TTT AGC CTT GAA CCT CTC CTG -3'(서열번호 4)]; 센스 프라이머의 밑줄친 곳이 *Nde*I 사이트를 나타내고, 안티센스 프라이머의 밑줄친 곳이 *Sal*I 사이트를 나타낸다)을 이용하여 PCR 증폭되었다. 증폭되어진 DNA 절편은 서열을 확인한 후 *Nde*I 및 *Sal*I로 다이제스트 되었다. 분절은 플라스미드 pET-24a(+ )의 상응하는 사이트에 연결되고, 얻어진 재조합 플라스미드가 *E. coli* BL21-codonPlus(DE3)-RIL을 형질전환시키는데 사용되었다. 유전자의 과량발현은 이소프로필- $\beta$ -D-티오갈락토피라노사이드(IPTG)를 중간 기하급수적 성장기에 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 항온 배양함으로써 유도되었다. 세포는 원심분리(4°C에서 20분간 6,000 x g)를 통하여 얻어졌고, 0.1M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)에서 재현탁시켰다. 세포는 초음파에 의해서 분쇄되어지고, 원심분리(4°C에서 30분간 20,000 x g)에 의해서 분리되었다. 얻어진 상등액은 TALON™ 금속 친화성 레진(BD Bioscience Clontech, 파우로 알토, 캘리포니아)의 컬럼에 처리되고, 0.1 M KCl 및 10% 글리세롤을 포함하는 50mM 트리스-HCl 완충용액(pH 8.0)안의 10mM 이미다졸(시그마, 세인트 루이스, 미주리)로 세척되었고, TNA1\_lig는 완충용액내의 300mM의 이미다졸로 용출되었다. 모아진 분획은 50 mM 트리스-HCl(pH 7.5), 1 mM DTT, 1mM EDTA, 및 10% 글리세롤을 포함하는 저장 완충용액으로 투석되어졌다. 단백질 농도는 브래드포드의 비색분석 방법에 의해 결정되었다. 단백질의 정제도는 표준 방법으로 수행되어진 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 분석에 의해서 조사되었다.

게놈 서열 분석에 의해 *T. Kodakarensis* (Nakatani 200)로부터의 리가아제와 비슷한 562개의 아미노산으로 이루어진 단백질(서열번호 2)을 암호화하는 오픈 리딩 프레임(1,689 bp; 서열번호 1)이 발견되었다. 리가아제의 활성화에 필수적이고 모든 고세균의 서열 사이에서 보존되어져 있는 대부분의 잔기는 TNA1\_lig에 잘 보존되어져 있었다(도 1). - TNA1\_lig에서 Phe182에서 Ala206 및 6개의 모티프(I, III, IIIa, IV, V, VI)(subramanya 1996). ATP 분자와 반응하는 잔기는 또한 보존되어져 있었다. -AMP Lys252(AMP 결합), Arg257, Arg272, 및 Glu302 (리보스 결합), Phe342(퓨린 끼움) 및 Lys423(인산 결합), 이는 TNA1\_lig가 리가아제 활성을 위해서 조효소로 ATP가 필요하다는 것을 의미한다. 그러나, Asn416 잔기는 사람 효소에서의 Lys737에 상응하는 위치를 대체했다(Tomkinson 1990). 페어와이즈 어라인먼트에서,

TNA1\_lig의 아미노산 서열은 *Thermococcus kodakaransis* KOD1 (82.0% 동일성, gi:7160399), *Pyrococcus abyssi* (75.0% 동일성, gi:5457975), *Pyrococcus furiosus* DSM3638 (72.0% 동일성, gi:18893788), 및 *Archaeoglobus fulgidus* DSM4304 (50.5% 동일성, gi:11498231)로부터 높은 유사성을 보였다. TNA1\_lig 유전자는 PCR 증폭에 의해서 클론되었고, 발현된 효소는 상기 전술한 바와같이 분리되었다. SDS/PAGE의한 분석은 63-kDa 단백질(도 2)이었고, 이것은 62-kDa 단백질 및 C-말단에서의 LEH6-(His-Tag)1-kDa 펩타이드로 구성된 융합 생산물의 예상되었던 사이즈이고, 이것이 분리되어진 시료의 주된 성분이었다.

**[실시예 2] 효소의 생화학적 성질**

**리가아제 기질**

DNA 결합 및 라이게이션 분석에 사용되어진 기질은 중앙에 닉(nick)이 있는 70bp의 DNA 듀플렉스(duplex)이다. DNA 듀플렉스는 다음과 같이 70단위 주형 가닥에 35단위의 올리고데옥시뉴클레오타이드 두 개를 어닐링함으로써 형성되었다. 주형의 5' 사이트에 상보적인 3NA-Com 올리고머(5'-GGTCTAGAGGAGCGTCGAGTACCGTGGTTCGCGTC-3'(서열 번호 5), 20 pmol)는 37°C에서 1시간 동안 200 $\mu$ Ci[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(3000 Ci/mmol, 암스테르담 바이오사이언스, 영국)의 존재하에서 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제에 의해서 라디오 레이블되었다. 레이블된 올리고머는 어닐링 완충용액(20mM 트리스-HCl, pH 8.0, 및 10mM KCl)에서 주형 가닥(NA-Tem, 5'-GACGCGAACCACGGTACTCGACGCTCCTCTAGACCCGACCTGTTGGCATGCAGCTACGGATCCGGACTCG-3'(서열번호 6))에 주형 가닥의 3' 사이트에 상보적인 5NA-com 올리고머((5'-CGAGTCCGGATCCGTAGCTGCATGCCAACAGGTCG-3'(서열번호 7)가 재결합되었다. 혼합물은 95°C로 5분 동안 가열한 후에 대기온도로 서냉 되었다. 상기 성분들의 몰비는 3NA-com, 5-NA-com, 및 NA-Tem이 어닐링 혼합물에서 각각 1:1:1 이었다.

**닉-연결 활성화도 분석**

DNA 리가아제의 닉-연결 활성화도에 대한 분석은 쏘올브자아나르도티어 등(Thorbjarnardottir 1995)의 방법에 의하여 수행하였다. 닉-연결 활성화도 분석을 위한 기질 준비에 사용된 올리고데옥시뉴클레오타이드의 서열은 상기 설명된 바와 같다. 그러나, 3NA-Com 올리고머가 3'-말단에 바이오틴으로 레이블되었고, 5'-말단에 인산화되었다. 그리고 5NA-com 올리고머는 5'-말단에서 형광물질로 레이블되었다. TNA1-lig (0.2 pmol)이 20  $\mu$ l의 표준 분석 완충용액(20mM 트리스-HCl, pH 8.0, 10mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP 및 0.01% BSA)에서 5pmole의 재결합된 기질과 혼합되었다. DNA 리가아제의 활성화는 15분간 80°C에서 분석되었다. 반응은 2.0  $\mu$ l의 0.1M EDTA를 첨가하여 종결되었고, 얼음에서 10분간 항온보관되었다. 각각 반응된 시료로부터 세벌의 20 $\mu$ l의 일부량이 스트렙타비딘 코팅된 96-웰 마이크로타이터 플레이트(MaxiSorp; Nunc, 덴마크)에 30 $\mu$ l의 세척 완충용액(100 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl 및 0.05% 트윈20)과 함께 웰들에게 올려졌다. 플레이트는 1시간동안 37°C 에서 항온보관 되었고, 멸균수로 두 번 세척되고, 변성 완충용액(0.1 N NaOH 및 0.05% 트윈20)으로 한 번 더 세척하고, 50 $\mu$ l의 세척 완충용액에서 1:3000 희석된 항-플루레신알카라인 포스페이트 컨쥬게이트(뵈링거-만하임, 독일)로 30분간 37°C에서 항온보관 되었다. 세척 완충용액으로 6번 세척한 다음에, 50 $\mu$ l의 새로운 기질 용액(5mM p-니트로페닐 포스페이트, 100mM 트리스-HCl, pH 9.0, 1mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.5mM ZnCl<sub>2</sub>)이 첨가되고 1시간 동안 37°C에서 항온보관되었다. 얻어진 황색이 분광기로 405nm에서 읽혀졌다.

**라이게이션 분석**

DNA 라이게이션 분석을 위해, 20mM 트리스-HCl, pH 8.0, 10mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 1mM ATP, 0.2 pmol의 <sup>32</sup>P-레이블된 닉(nick)되어진 듀플렉스 기질반응 혼합물(20 $\mu$ l) 및 1 pmol TNA1\_lig가 20분간 80°C에서 항온보관 되었다. 항온보관 후에, 반응은 EDTA 및 포름아마이드의 첨가에 의해 정지되었다. 반응되어진 샘플은 5분 동안 95°C에서 가열되었고, 다음으로 TBE안에 7 M 우리아를 포함하는 15% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동 되었다. 라이게이션 산물은 건조된 겔의 오토라디오그래피에 의해 가시화 되었다.

TNA1\_lig의 리가아제 활성화는 전술한 바와 같이 측정되었다. 활성화는 고온에서 강하게 촉진되었고, 최적 온도가 80°C 이었고, 40-50°C에서는 최대 활성화의 40%보다 적었다(도 3). TNA1\_lig에 대한 pH의 영향은 pH 6.0 내지 10.0 사이에서 측정되었고, 최적 활성화도는 pH 7.5 이었다. Mg<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup>의 첨가는 활성을 상당히 증가시켰지만 이들 이온은 Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, 및

$Ni^{2+}$ 에 의해서 대체되어질 수 없었다(도 4).  $Mg^{2+}$ 의 최적 농도는 0.5mM으로 결정되었다. 흥미롭게도, 리가아제 활성은  $Mg^{2+}$ 가 없어도 관측이 되었다. TNA1\_lig 활성을 위해서 염을 필요로 하지 않는 것으로 보였으나, 40mM의 NaCl 및 6 mM KCl은 활성도를 각각 20% 및 30% 증가시켰다(도 5).

ATP 분자와 결합하는 잔기의 존재는 APT을 필요로 하는 것을 의미할 수 있으나, 고세균 리가아제의  $NAD^+$  요구가 있다는 보고들은 서열 분석이 고세균 리가아제에서 조효소의 요구를 예측하는데 충분하지 않다는 것을 제시한다. 이점을 명확히 하기 위해, TNA1\_lig의 조효소 요구가 시험되었다. 도 6에서 보이는 것처럼 ATP 및  $NAD^+$ 가 TNA1\_lig 활성도를 농도 의존적으로 촉진한다. 상기 리가아제의 활성도는 ATP 및  $NAD^+$ 가 없으면 매우 낮았다. 재조합 TNA1\_lig 준비동안에 ATP의 오염 논란을 없애기 위하여, TNA1\_lig가 오염된 ATP를 소모시키기 위해서 레이블되지 않은 기질과 전-항온반응 되었으나, 전-항온보관되어진 TNA1\_lig의 리가아제 활성은 변하지 않았다. 더욱더,  $^{32}P$ -레이블된 기질을 이용한 분석에서도 확인되었다. 도 7에서 보이듯이, 70단위 올리고뉴클레오타이드인 라이게이션 산물은, ATP 뿐만아니라  $NAD^+$ 로 보충되어진 반응에서 나타났다. 이들 결과는 TNA1\_lig가 두개의 조효소와 함께 같은 촉매 잔기를 사용 할 것 같다는 것을 제시한다.  $NAD^+$ 로 보충되어진 효소 활성은 ATP가 라이게이션 분석에서 이용되었을 때 보다 효소 활성이 높았고, 이것은  $NAD^+$ 가 더 선호되는 조효소임을 가르킨다. 그러나,  $NAD^+$ 의 효과는 Nick-연결 분석에서 ATP의 효과의 것과 비슷하였다.

### 발명의 효과

본 발명에 따른 DNA 리가아제 효소는 고호열인 신규한 DNA 리가아제 효소이다. 따라서 라이게이션(ligation) 분석을 통한 단일 뉴클레오타이드 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 결정하는데 유용하며, 단일-염기 유전 질환을 증폭 및 검출하기 위한 리가아제 연쇄 반응(Ligase chain reaction; LCR)에 적용가능하다.

### 참고문헌

1. Nakatani, M., S. Ezaki, H. Atomi, and T. Imanaka. 2000. A DNA ligase from a hyperthermophilic archaeon with unique cofactor specificity. *J. Bacteriol.* 182:6424-6433.
2. Rolland, J., Y. Gueguen, C. Persillon, J. Masson, and J. Dietrich. 2004. Characterization of a thermophilic DNA ligase from the archaeon *Thermococcus fumicolans*. *FEMS.* 236:267-273.
3. Lehman, I. R. 1974. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science.* 186:790-797.
4. Jessberger, R., and P. Berg. 1991. Repair of deletions and double-strand gaps by homologous recombination in a mammalian in vitro system. *Mol. Cell. Biol.* 11:445-457.
5. Li, J. J., and T. J. Kelly. 1984. Simian virus 40 DNA replication in vitro. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6973-6977.
6. Wood, R. D., P. Robins, and T. Lindahl. 1988. Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell.* 53:97-106.
7. Kletzin, A. 1992. Molecular characterization of a DNA ligase gene of the extremely thermophilic archaeon *Desulfurolobus ambivlaens* shows close phylogenetic relationship to eukaryotic ligases. *Nucleic Acids Res.* 20:5389-5396.
8. Thorbjarnardottir, S. H., Z. O. Jonsson, O. S. Andresson, J. K. Kristjansson, G. Eggertsson, and A. Palsdottir. 1995. Cloning and sequence analysis of the DNA ligase-encoding gene of *Rhodothermus marinus*, and overproduction, purification and characterization of two thermophilic DNA ligases. *Gene* 161:1-6.

9. Johnson, A. P., and M. P. Fairman. 1997. The identification and purification of a novel mammalian DNA ligase. *Mutat. Res.* 383:205-212.
10. Robins, P., and T. Lindahl. 1996. DNA ligase IV from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 271:24257-24261.
11. Tomkinson, A. E., E. Roberts, G. Daly, N. F. Totty, and T. Lindahl. 1991. Three distinct DNA ligases in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 266:21728-21735.
12. Odell, M., S. M. Kerr, and G. L. Smith. 1996. Ligation of double-stranded and single-stranded [oligo(dT)] DNA by vaccinia virus DNA ligase. *Virology.* 221:120-129.
13. Parks, R. J., B. D. Lichty, C. Karakis, and D. H. Evans. 1994. Characterization of the Shope fibroma virus DNA ligase gene. *Virology.* 202:642-650.
14. Doherty, A. J., S. R. Ashford, H. S. Subramanya, and D. B. Wigley. 1996. Bacteriophage T7 DNA ligase. Overexpression, purification, crystallization, and characterization. *J. Biol. Chem.* 271:11083-11089.
15. Knopf, K. W. 1977. Simple isolation method and assay for T4 DNA ligase and characterization of the purified enzyme. *Eur. J. Biochem.* 73:33-38.
16. Brannigan, J. A., S. R. Ashford, A. J. Doherty, D. J. Timson, and D. B. Wigley. 1999. Nucleotide sequence, heterologous expression and novel purification of DNA ligase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1432:413-418.
17. Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, and A. Nakata. 1986. Nucleotide sequence of the lig gene and primary structure of DNA ligase of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 204:1-7.
18. Sriskanda, V., Z. Kelman, J. Hurwitz, and S. Shuman. 2000. Characterization of an ATP-dependent DNA ligase from the thermophilic archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Nucleic Acids Res.* 28:2221-2228.
19. Klenk, H. P., R. A. Clayton, J. F. Tomb, O. White, K. E. Nelson, K. A. Ketchum, R. J. Dodson, M. Gwinn, E. K. Hickey, J. D. Peterson, D. L. Richardson, A. R. Kerlavage, D. E. Graham, N. C. Kyrpides, R. D. Fleischmann, J. Quackenbush, N. H. Lee, G. G. Sutton, S. Gill, E. F. Kirkness, B. A. Dougherty, K. McKenney, M. D. Adams, B. Loftus, S. Peterson, C. I. Reich, L. K. McNeil, J. H. Badger, A. Glodek, L. Zhou, R. Overbeek, J. D. Gocayne, J. F. Weidman, L. McDonald, T. Utterback, M. D. Cotton, T. Spriggs, P. Artiach, B. P. Kaine, S. M. Sykes, P. W. Sadow, K. P. D'Andrea, C. Bowman, C. Fujii, S. A. Garland, T. M. Mason, G. J. Olsen, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese, and J. C. Venter. 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeohlobus fulgidus*. *Nature* 390:364-370.
20. Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. FitzGerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. M. Geoghagen, J. F. Weidman, J. L. Fuhrman, D. Nguyen, T. R. Utterback, J. M. Kelley, J. D. Peterson, P. W. Sadow, M. C. Hanna, M. D. Cotton, K. M. Roberts, M. A. Hurst, B. P. Kaine, M. Borodovsky, H. P. Klenk, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese, and J. C. Venter. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273:1058-1073.
21. Rolland, J., Y. Gueguen, C. Persillon, J. Masson, and J. Dietrich. 2004. Characterization of a thermophilic DNA ligase from the archaeon *Thermococcus fumicolans*. *FEMS.* 236:267-273.
22. Barany, F. 1991. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193.



23. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

24. Tomkinson, A. E., D. D. Lasko, G. Daly, and T. Lindahl. 1990. Mammalian DNA ligases. Catalytic domain and size of DNA ligase I. J. Biol. Chem. 265:12611-12617.

### 도면의 간단한 설명

도 1은 *Thermococcus* sp. NA1 (TNA1), *T. kodakarensis* KOD1(TkKOD1, gi:57160399), *Pyrococcus furiosus* GE5 (PaGE5, gi:545975), 및 *P. furiosus* DSM3638(pfDSM3638, gi:18893788)로부터의 DNA 리가아제의 아미노산 서열을 비교한 것을 보인다. 대시는 갭(gap)을 나타내고, 오른쪽의 숫자는 원래 서열안에 있는 마지막 잔기의 번호를 나타낸다. 4 개의 효소 사이에 같은 잔기는 \* 로 나타내었고 보존적 치환을 가진 잔기 및 반-보존적으로 치환된 것은 : 으로 나타내었다. 영역 I에서 IV까지, ATP-의존적 DNA 리가아제의 보존되어진 영역; 고세균의 DNA 리가아제에서 보존된 서열이 표시되었다.

도 2는 분리정제된 효소의 SDS-PAGE(12%) 분석결과이다. M, 표준시료; 1, 초음파 처리된 조추출액; 2, 열처리후 조추출액 3, His-태그된 친화성 크로마토그래피에서 용출된 단백질 분획. 분자량 표준물(레인 M)은 포스포릴라아제 b (103 kDa), 소 혈청 알부민 (77 kDa), 오발부민 (50 kDa), 카보닉 안하이드라아제 (34.3 kDa), 콩 트립신 억제제 (28.8 kDa), 및 리소자임 (20.7 kDa)이다.

도 3은 TNA1-lig의 활성에 대한 pH (A) 및 온도 (B)의 영향을 보인다. A. 활성도 분석은 다음의 완충용액(각각 50mM)에서 표준적인 방법으로 행하여졌다: MES, pH 6.0-7.0; 트리스-HCl, pH 7.0-9.0; 글리신, pH 9.0-10.0. B. 시료 온도가 40 에서 80°C로 올라가면서 표준 조건에서 활성분석이 행하여졌다.

도 4는 TNA1-lig의 활성에 대한 여러 종류의 2가 이온 (A) 및 MgCl<sub>2</sub> 농도 (B) 효과를 보인다. 활성도 분석은 여러 농도의 NaCl 존재하에서 수행되었다. B: 활성도 분석은 여러 농도의 KCl의 존재하에서 수행되었다.

도 5은 TNA1-lig의 활성도에 대한 NaCl (A) 및 KCl 농도 (B)의 효과를 보인다. A: 여러 농도의 NaCl 존재하에서 활성도 분석이 수행되었다. B: 여러 농도의 KCl 존재하에서 활성도 분석이 수행되었다.

도 6 TNA1\_lig의 활성도에 대한 조효소 특이성(A), ATP 농도 (B), NAD<sup>+</sup> 농도 (C)을 보인다. A: 활성도 분석은 여러 가지 dNTP가 포함되어 있는 표준의 Nick-연결 활성도 분석 완충용액에서 행하여졌다. B: 활성도 분석은 여러 가지 농도의 ATP의 존재하에서 수행되었다. C: 활성도 분석은 여러 가지 NAD<sup>+</sup> 농도의 존재하에서 수행되었다.

도 7은 ATP 및 NAD<sup>+</sup>로의 TNA\_lig의 라이게이션 분석을 보인다. Nick-연결 활성은 <sup>32</sup>P-레이블된 Nick 기질이 연결되어지는 것에 의해 결정되어진다. 사이즈의 변화는 변성 15% 폴리아크릴아마이드-7M 우리아 겔위에서 관측된다. 레인 1, 80°C에서 20분간 조효소로 ATP로 반응한 후; 레인 2, 80°C에서 20분간 조효소로 NAD<sup>+</sup>로 반응한 후; 레인 3, 80°C에서 20분간 조효소로 ATP로 반응하기 전.

도 8은 본 발명에 따른 재조합 DNA 리가아제 효소를 가지고 있는 재조합플라스미드의 개열지도를 보인다.

### 도면

도면1

```

TNA1      MGDIMKYTELSDLYRRLEKTLTKLTKFVADFLKKTDPDELLEVPVYIILGKVPFDWDERE 60
TkKOD1    MSDMRYSELADLYRRLEKTLTKLTKFVADFLKKTDPDELLEIIPYLIILGKVPFDWDERE 60
PaGE5     ---MRYIELAQLYGKLEKTTMKLIKTRLVADFLKVPDPHLEFIIPYLIILGDVFPWDERE 57
PFDSM3638 ---MRYIELAQLYGKLEKTTMKLIKTRLVADFLKVPDPHLEFIIPYLIILGEVFPWDERE 57
          *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

TNA1      LGVGEKLLIKAVSMATGVQEREIENSVKDTGDLGESVALAKKKKQKSFSSQPLTIKRKY 120
TkKOD1    LGVGEKLLIKAVSMATGVPEKEIEDSVKDTGDLGESVALAKKKKQKSFSSQPLTIKRKY 120
PaGE5     LGVGEKLLIKAVSMATGIDSKIEIENSVKDTGDLGESIALAVKRRKQKSFSSQPLTIKRKY 117
PFDSM3638 LGVGEKLLIKAVSMATGIDAKEIEESVDTGDLGESIALAVKRRKQKSFSSQPLTIKRKY 117
          *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

TNA1      QTFIKIAEASGEGSQDRKLYLANIFMDAQPEEGKYIARTVLMGMRGTGVAEGLRDAIAE 180
TkKOD1    DTFVKIAEASGEGSQDRKMYLANLFMDAEPPEEGKYIARTVLMGMRGTGVAEGLRDAIAE 180
PaGE5     QTLVKVAETTGEQSDDKMYLANLFMDAEP I EAKYIARTVLMGMRGTGVAEGLRDAIISL 177
PFDSM3638 QTLVKVAETTGEQSDDKMYLANLFMDAEPLEAKYLARTILGTMRTGVAEGLRDAIAM 177
          :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

TNA1      AFVKVAVELVERAYMLTSDFGYVAKLEGNLGLKGVHIOIGKPIRPMLAQNAASVKEAL 240
TkKOD1    AFRVKPELVERAYMLTSDFGYVAKLEGNLGLSKVRIOIGKPIRPMLAQNAASVKDAL 240
PaGE5     AFNVKVELVERAYMLTSDFGYVAKIAKTEGNLGLAKVTIOIGKPIKPLAQQAANIKEAL 237
PFDSM3638 AFHVKVELVERAYMLTSDFGYVAKIAKLEGNLGLAKVOVOLGKPIKPLAQQAASIRDAL 237
          **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

          I                                     III
TNA1      LEMGAEAEFEKYDGARVQVHKDGRVVIYSRRLNVTRSIPEVDAIKASIKSEKAIIVE 300
TkKOD1    IEMGAEAEFEKYDGARVQVHKDGVVIYSRRLNVTRSIPEVIEAIKAALKPEKAIIVE 300
PaGE5     LEMGAEAEFEKYDGARVQVHKDGEKVTIYSRRLNVTRAIPEIVEAIKEALKPTKAIIVE 297
PFDSM3638 LEMGAEAEFEKYDGARVQVHKDGSKIYSRRLNVTRAIPEIVEALKEAIPEKAIIVE 297
          :***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

          IIIa
TNA1      GELVAVGEGGRPRPFQYVLRFRFRKYNIEEMIEKIPLELNLFDVLYVDGQSLIDTPFRER 360
TkKOD1    GELVAVGEGGRPRPFQYVLRFRFRKYNIDEMIEKIPLELNLFDVLYVDGQSLIETKIFIDR 360
PaGE5     GELVAVGEGGRPLPFQYVLRFRFRKYNIEEMMEKIPLELNLFDVLYVDGQSLIDTKFIMER 357
PFDSM3638 GELVAVGEGGRPLPFQYVLRFRFRKHNIEEMMEKIPLELNLFDVLYVDGQSLIDTKFIDR 357
          *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

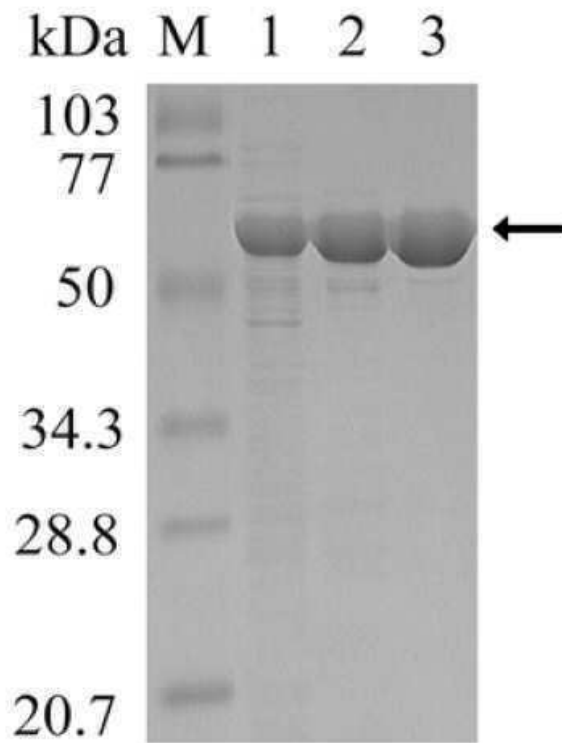
          IV
TNA1      RAKLEEIVVEGEKLLAQQLVTKKVEEAEEFYKALELGEGLMKRRLDSVYEPGNRGKK 420
TkKOD1    RNKLEEIVKESEKIKLAEQLIKTKVEEAEEFYRRALENGLEGLMKRRLDSIYEPGNRGKK 420
PaGE5     RKKLEEIVETNGVKIAENLI TKNVEEAEEFYKRALENGLEGLMKRRLDAVYEPGNRGKK 417
PFDSM3638 RRTLEEIKONEKIKVAENLI TKKVEEAEEFYKRALENGLEGLMKRRLDAVYEPGNRGKK 417
          *..*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

          V
TNA1      WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRHLLGSFLVAAYDPHSGEFVPGVKVSGFTDDELV 480
TkKOD1    WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRHLLGSFLVAAYDPHSGEFVPGVKVSGFTDDELV 480
PaGE5     WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRHLLGSFILGAYDPETGEFLEVGVKSGFTDDDLV 477
PFDSM3638 WLKIKPTMENLDLVIIGAEWGEGRRHLLGSFILGAYDPETGEFLEVGVKSGFTDDDLV 477
          *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

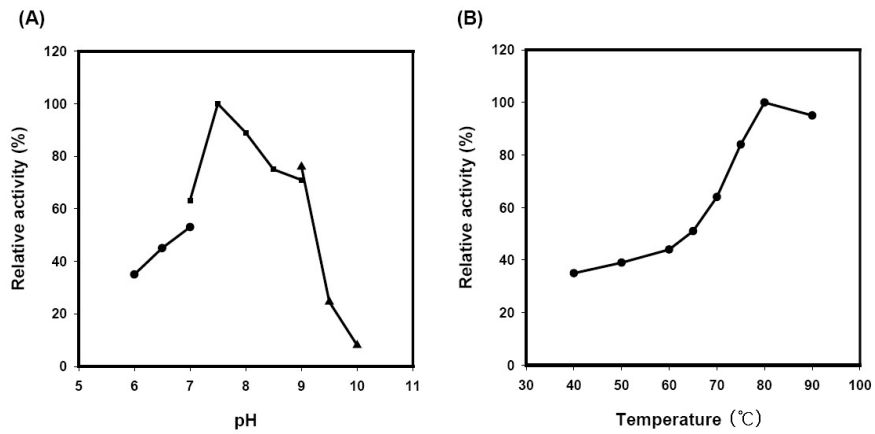
          VI
TNA1      EFTKMLKPLIIGGEGKFVEIEPKVVIQVTYQEIQKSPKYRSGFALRIPRYVALREDIISPE 540
TkKOD1    EFTKMLKPYIVRQEGKFVEIEPKFVIEVTYQEIQKSPKYRSGFALRIPRYVALREDIISPE 540
PaGE5     EFTKMLKPLIIEEGKRVVIOPKVVIQVTYQEIQKSPKYRSGFALRIPRYVALREDIISPE 537
PFDSM3638 EFTKMLKPLIIEEGKRVVIOPKVVIQVTYQEIQKSPKYRSGFALRIPRYVALREDIISPE 537
          *****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

TNA1      EADTIERIAQLYEFQERFKAKK--- 562
TkKOD1    EADTIERIAELYELQERFKAKK--- 562
PaGE5     DADTIERIAQLYELQERMKGKV--- 559
PFDSM3638 DADTIERIAQLYELQEKMKGVES 561
          :*****:*:*:*:*:*:*
    
```

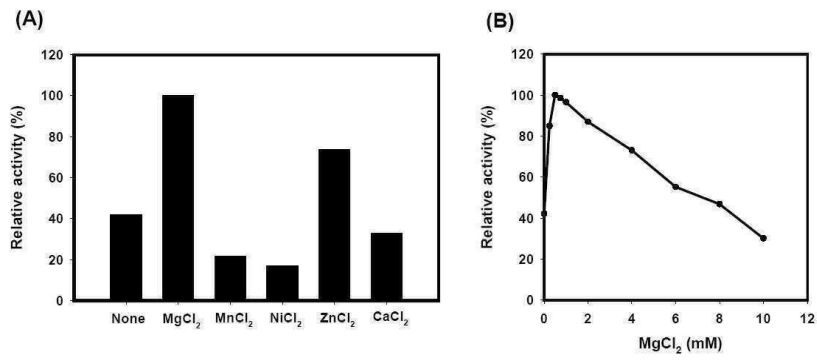
도면2



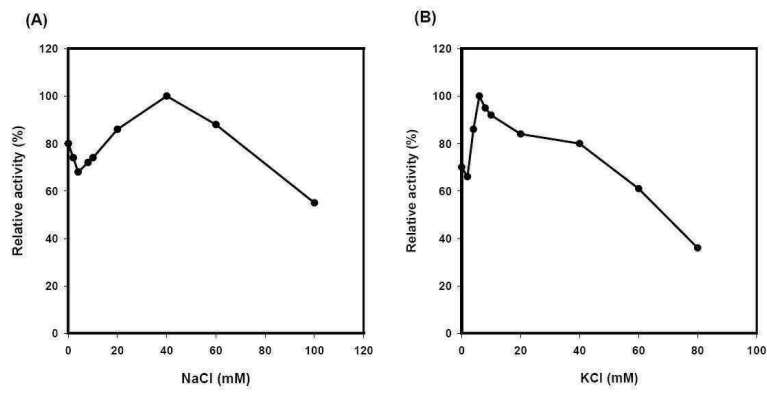
도면3



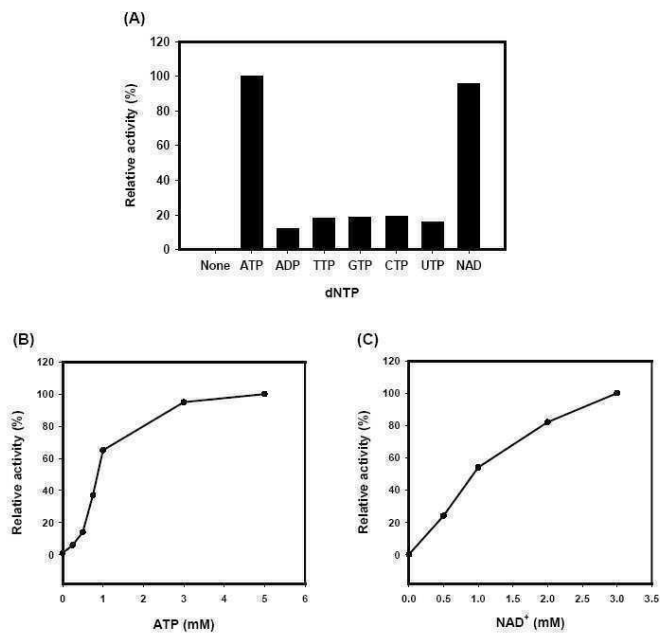
도면4



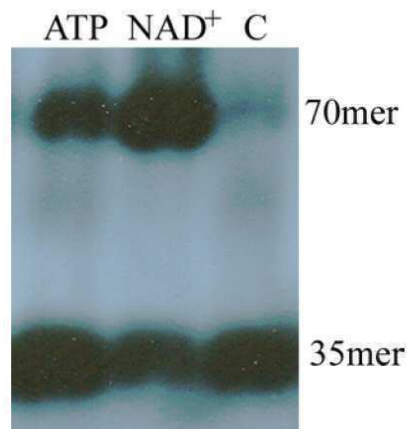
도면5



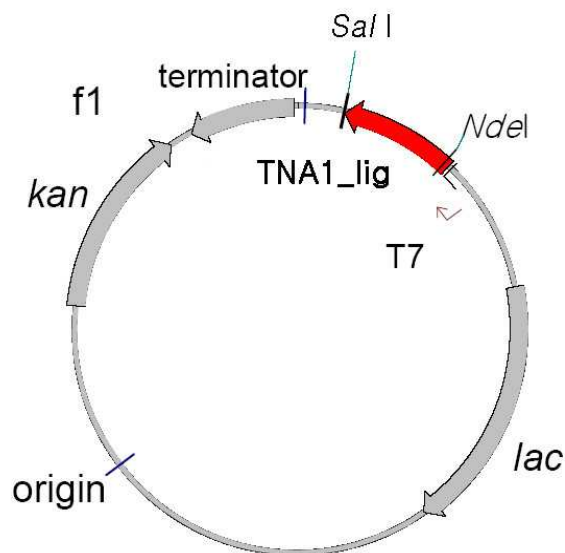
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> KOREA OCEAN RESEARCH AND DEVELOPMENT INSTITUTE
- <120> Hyperthermophilic Ligase Enzyme and Methods of Preparation Thereof
- <160> 7
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 1689
- <212> DNA

<213> Thermococcus sp.

<400> 1

atgggagaca tgaatacac tgaactctct gacotttacc gcaggctcga gaagactacc	60
ctcaaaacgc tcaagactaa gttcgtggcc gacttttctga agaaaactcc agatgagctt	120
ctcgagggtg tcccatacct gattcttggg aaggcttttc ccgattggga cgagagggag	180
cttgggtgtg gtgagaagct cctcataaag gccgtatcta tggcaaccgg tgttcaggag	240
agggaaatag agaactcagt caaggacacg ggagatctgg gcgagagcgt tgccttggca	300
ttaaagaaaa agaagcagaa gagcttcttc agccagccgc tcacgataaa gcgcgtttat	360
cagactttca ttaagatagc cgaagcgagt ggcgagggaa gccaggacag gaagctgaag	420
tacctcgcaa acatcttcat ggacgcccag ccggaagagg gtaaatacat agcaagaacc	480
gttctcggca tgatgagaac gggcgttgcc gagggcatac ttcgcgatgc catagccgag	540
gccttcaaag tcaaagccga gctcgttgag cgtgcctaca tgctcacgag cgacttcggc	600
tacgttgcaa aggtggcgaa gctcgaaggc aacgatggcc tagggaaggt tcacattcag	660
attgggaagc cgataaggcc gatgctcgcc cagaacgcgg cgagcgtcaa ggaggccctc	720
ctcgagatgg gcgccgaggc ggcattcgag ataaagtacg atggagcgag agttcaggtt	780
cacaaggacg gcgacagggg tgtaatctac tccaggcggc tggagaacgt cacgcgctct	840
atccccgagg tcgttgatgc cataaaggcg agcataaagt ccgaaaaagc gatagttgag	900
ggtgagcttg tcgctgtggg tgaggggtgga aggccaagac cttccagta tgcctcagg	960
cgcttcagga ggaaatacaa catcgaagag atgatagaga agatcccgtt ggagctcaac	1020
cttttcgacg tcctctacgt cgatggagaa cccctgatcg acaccccctt ccgagagagg	1080
agagctaagc ttgaagaaat cgtcagaggg ggcgaaaagc tcaagcttgc ccagcaactg	1140
gtcacgaaga aggtcgagga ggccgaggag ttctacaaga aggcccttga acttggccat	1200
gagggctctca tggcgaagag actcgattcc gtctacgagc ccggaaacag gggcaagaag	1260
tggctcaaga taaagcccac catggaagat ctogaccttg tcataattgg ggcggagtgg	1320
ggcgagggaa ggagggcaca cctgctcggc tccttctctg ttgcggccta tgacccgcac	1380
agcggtgagt ttgtgccggt cgggaaggtt ggcagcggct tcaccgatga agacctcgtt	1440
gagttacca agatgctcaa gcccctcatc atcgggtggtg agggcaaatt cgtggagatt	1500

gagccgaagg tggatcatcca ggtcacctac caggagatac agaagagtcc gaagtacagg 1560  
 agcggggtttg cgctgagggt cccgcgctac gtggctctga gagaggataa aagtcctgaa 1620  
 gaggccgaca cgatagagcg catcgcccag ctctacgagt tccaggagag gttcaaggct 1680  
 aaaaagtga 1689

<210> 2  
 <211> 562  
 <212> PRT  
 <213> Thermococcus sp.

<400> 2  
 Met Gly Asp Met Lys Tyr Thr Glu Leu Ser Asp Leu Tyr Arg Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Thr Thr Leu Lys Thr Leu Lys Thr Lys Phe Val Ala Asp Phe  
 20 25 30  
 Leu Lys Lys Thr Pro Asp Glu Leu Leu Glu Val Val Pro Tyr Leu Ile  
 35 40 45  
 Leu Gly Lys Val Phe Pro Asp Trp Asp Glu Arg Glu Leu Gly Val Gly  
 50 55 60  
 Glu Lys Leu Leu Ile Lys Ala Val Ser Met Ala Thr Gly Val Gln Glu  
 65 70 75 80  
 Arg Glu Ile Glu Asn Ser Val Lys Asp Thr Gly Asp Leu Gly Glu Ser  
 85 90 95  
 Val Ala Leu Ala Leu Lys Lys Lys Lys Gln Lys Ser Phe Phe Ser Gln  
 100 105 110  
 Pro Leu Thr Ile Lys Arg Val Tyr Gln Thr Phe Ile Lys Ile Ala Glu  
 115 120 125  
 Ala Ser Gly Glu Gly Ser Gln Asp Arg Lys Leu Lys Tyr Leu Ala Asn  
 130 135 140  
 Ile Phe Met Asp Ala Gln Pro Glu Glu Gly Lys Tyr Ile Ala Arg Thr  
 145 150 155 160  
 Val Leu Gly Met Met Arg Thr Gly Val Ala Glu Gly Ile Leu Arg Asp  
 165 170 175  
 Ala Ile Ala Glu Ala Phe Lys Val Lys Ala Glu Leu Val Glu Arg Ala  
 180 185 190  
 Tyr Met Leu Thr Ser Asp Phe Gly Tyr Val Ala Lys Val Ala Lys Leu





Glu Phe Thr Lys Met Leu Lys Pro Leu Ile Ile Gly Gly Glu Gly Lys  
 485 490 495

Phe Val Glu Ile Glu Pro Lys Val Val Ile Gln Val Thr Tyr Gln Glu  
 500 505 510

Ile Gln Lys Ser Pro Lys Tyr Arg Ser Gly Phe Ala Leu Arg Phe Pro  
 515 520 525

Arg Tyr Val Ala Leu Arg Glu Asp Lys Ser Pro Glu Glu Ala Asp Thr  
 530 535 540

Ile Glu Arg Ile Ala Gln Leu Tyr Glu Phe Gln Glu Arg Phe Lys Ala  
 545 550 555 560

Lys Lys

<210> 3  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TNA1\_lig sense primer

<400> 3  
 cgacccggca tatgggagac atgaaataca ctgaactc

38

<210> 4  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> TNA1\_lig antesense primer

<400> 4  
 Cys Thr Cys Cys Ala Cys Ala Thr Gly Thr Cys Gly Ala Cys Cys Thr  
 1 5 10 15

Thr Thr Thr Thr Ala Gly Cys Cys Thr Thr Gly Ala Ala Cys Cys Thr  
 20 25 30

Cys Thr Cys Cys Thr Gly  
 35

<210> 5  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> 3NA-com oligonucleotide  
  
 <400> 5  
 ggtctagagg agcgtcgagt accgtggttc gcgtc 35  
  
 <210> 6  
 <211> 70  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> NA-tem oligonucleotide  
  
 <400> 6  
 gacgcgaacc acggtactcg acgctcctct agacccgacc tgttggcatg cagctacgga 60  
 tccggactcg 70  
  
 <210> 7  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> 5NA-com oligonucleotide  
  
 <400> 7  
 cgagtccgga tccgtagctg catgccaaca ggtcg 35